

JP 99/02818

PCT/JP 99/02818

28.05.99

ESU

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 16 JUL 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 5月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第149530号

出 願 人

Applicant (s):

持田製薬株式会社

09/701486

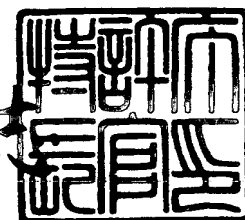
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山 佐 平 建 志



出証番号 出証特平11-3043000

【書類名】 特許願  
【整理番号】 MD0487  
【提出日】 平成10年 5月29日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
【発明の名称】 自己免疫性脱髄性疾患予防・治療剤  
【請求項の数】 7  
【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地

持田製薬株式会社

内

【氏名】 矢富 文博

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代表者】 持田 英

【代理人】

【識別番号】 100080159

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号

早川トナ

カイビル3階

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号

早川ト

ナカイビル3階

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 (FERMBP-5854) 受託証の謄本 1

【物件名】 (FERMBP-5855) 受託証の謄本 1

【物件名】 (FERMBP-5535) 受託証の謄本 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 自己免疫性脱髄性疾患予防・治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤。

【請求項 2】

前記アポトーシスを抑制する物質が Fas アンタゴニストである請求項 1 に記載の予防・治療剤。

【請求項 3】

前記アポトーシスを抑制する物質が Fas-Fas リガンドの結合を抑制する物質である請求項 1 または 2 に記載の予防・治療剤。

【請求項 4】

前記アポトーシスを抑制する物質が Fas 誘導体である請求項 1～3 のいずれかに記載の予防・治療剤。

【請求項 5】

前記アポトーシスを抑制する物質が抗 Fas リガンド抗体である請求項 1～3 のいずれかに記載の予防・治療剤。

【請求項 6】

前記自己免疫性脱髄性疾患が中枢神経系に脱髄が起きている疾患であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の予防・治療剤。

【請求項 7】

前記自己免疫性脱髄性疾患が急性散在性脳脊髄炎及び多発性硬化症からなる群から選ばれる少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアポトーシスを抑制する物質を有効成分として含有することを特徴と

する自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

Fasは、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体であるFas抗体(Yonehara S. 等、J. Exp. Med., 169巻、1747-1756頁、1989年)によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原である。Itoh N. 等によって、Fas遺伝子がクローニングされ、Fasが約45kDの細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列からTNFレセプターファミリーに属することが判明した(Cell, 66巻、233-243頁、1991年)。また、マウスFas遺伝子もクローニングされ、Fas mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された(Watanabe-Fukunaga等、J. Immunol., 148巻、1274-1279頁、1992年)。

【0003】

ヒトFasリガンドは、Fasを発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、Nagata等により報告されたポリペプチドである(Takahashi T. 等、International Immunology, 6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトFasリガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40kDのII型糖蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている(Tanaka M. 等、EMBO Journal, 14巻、1129-1135頁、1995年)。また、ヒトFasリガンドはラットFasリガンド(Suda T. 等、Cell, 75巻、1169-1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Takahashi T. 等、Cell, 76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドはヒトFasのみでなくマウスFasをも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラットFasリガンド及びマウスFasリガンドも、ヒトFasを認識してアポトーシスを誘導することができる。

【0004】

また、Fasを介するアポトーシスの細胞内シグナル伝達機序に関しても研究が進んでおり、Fasの細胞内領域、特にデスドメイン（Death domain）と呼ばれる領域と相互作用してシグナルを伝達または抑制する因子の同定及びクローニングが報告されている他、インターロイキン-1変換酵素（ICE）関連チオールプロテアーゼがFasを介するアポトーシスのシグナル伝達に寄与している可能性が示唆されている。

近年、アポトーシス、特にFasを介するアポトーシスと種々の疾患及び生理現象との関連が示唆されている。たとえば、ウイルス性劇症肝炎における肝細胞死及びある種の自己免疫疾患等において、Fasを介するアポトーシスの異常が関与する可能性が示唆されている。

また、Fas/Fasリガンド系はアポトーシス以外の機能、たとえば、好中球に作用して起炎症性に働く作用等も担っている可能性が示唆されている（Kayagaki N. 等、臨床免疫 28巻、667-675頁、1996年）。

#### 【0005】

自己免疫疾患は、自己反応性リンパ球が自己抗原に反応し攻撃することにより起こる疾患であり様々な症状を呈する。正常時は生体は自己抗原に対して過剰な免疫反応を示さないため自己寛容が成立しているが、免疫調節機能に異常が生じると自己の成分に対して抗体を産生したり、自己反応性リンパ球が出現するようになる。この自己反応性T細胞は、本来、胸腺においてアポトーシスにより除去されるものであるが、何らかの異常により排除されことなく末梢に移行するとそこで蓄積されるようになる。また、B細胞においても自己寛容が成立しており、自己反応性B細胞もアポトーシスで除去されるが、何らかの異常により除去されない場合、T細胞と同様に末梢に蓄積されることとなる。このような自己反応性リンパ球が自己免疫疾患を引き起こす原因となる。

#### 【0006】

自己免疫性脱髄性疾患は、神経系に特異的な自己抗体により引き起こされ、髄鞘とその形成細胞が選択的に障害されて起こる疾患である。組織学的には髄鞘の消失、静脈周囲の細胞浸潤が認められる。臨床症状は失明、感覚障害、四肢の麻痺などの神経症状等が挙げられる。

脱髄性疾患は詳細な原因は解明されておらず、例えば寛解と再発を繰り返す多発性硬化症等の脱髄性炎症の発症原因は、自己免疫が関与する可能性 (De Keyser J., Neurology, 38巻, 371~374頁, 1988年) の他に、ウイルス感染 (Carp R. I. 等, Prog. Med. Virol., 24巻, 158~177頁, 1978年) が示唆されている。

従来の脱髄性疾患の治療は、免疫抑制剤とACTH (副腎皮質刺激ホルモン) を併用する等の非特異的な免疫抑制による治療法 (Saida K. 最新医学 10巻, 1963~1971頁 1991年) が挙げられるが、この治療法では長期的効果が認められず、さらに慢性進行型には効果が得られていない (Weiner等, Neurology 39巻, 1143~1149頁, 1989年)。このため、最近の治療では自己免疫T細胞の活動を特異的に抑制する方法として、T細胞ワクチン (Ben-Nun A等, Nature, 292巻, 60~61頁, 1981年)、T細胞レセプターワクチン (J. Immunol, 152巻, 2510頁, 1994年、J. Immunol, 152巻, 2520頁, 1994年)、経口免疫寛容 (Science, 259巻, 1321頁, 1993年)、ペプチドアナログ (Immunol. Today, 14巻, 602~609頁, 1993年) または抗CD4抗体等の投与が検討されている。しかし、これら治療剤の一部 (T細胞レセプターワクチン) において自己抗原反応性T細胞の末梢血中の頻度を低下させる効果等が報告されているにすぎず、現状では著明な効果を示す結果は得られてはいない。

#### 【0007】

脊髄のホモジネートを結核死菌を含むフロイント完全アジュバントとともに皮下接種すると感受性のある動物は10~14日後に後肢麻痺などの脳脊髄炎の症状を発症する。これが実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) の原形である。実験動物を脳由来の蛋白質抗原またはペプチドで感作することにより誘導される代表的な自己免疫病モデルであり、多発性硬化症および急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) の疾患モデルとして古くから精力的に研究されてきた。これまで、EAEの解析によって中枢神経系に発現するミエリン塩基性蛋白、プロテオ

リビッド蛋白などの自己抗原に特異的なT細胞が関与していることが (Ota K. 等、Nature, 346巻、183~187頁, 1990年) 明らかになっている。

# 【0008】

近年、多発性硬化症とFas/Fasリガンド系を介したアポトーシスの関連についての研究が報告されている。Sameer D. 等は、ヒト多発性硬化症の病変部位において、ミクログリア細胞と浸潤T細胞にFasリガンドの発現を、オリゴデンドロサイトにFasの発現を認めたと報告した (J. Exp. Med., 184巻、2361~2370頁, 1996年)。Kimberly A. 等 (J. Immunol., 158巻、3096~3099頁, 1997年) 及び Hanspeter W. 等 (J. Immunol., 158巻、3100~3103頁, 1997年) は、FasまたはFasリガンドの遺伝的欠損マウスであるそれぞれlprマウスまたはgldマウスを用いた多発性硬化症の動物実験から、Fas/Fasリガンドを介したアポトーシスが多発性硬化症に関与することを示唆した。一方、Eileen A. 等 (J. Clin. Invest., 98巻、1602~1612頁, 1996年) 及び Suzana M. 等 (J. Exp. Med., 186巻、507~515頁, 1997年) は同じlprマウスまたはgldマウスを用いた多発性硬化症の動物実験から、Fas/Fasリガンドを介したアポトーシスが多発性硬化症に関与しないことを示唆した。すなわち、多発性硬化症の病態とFas/Fasリガンド系を介したアポトーシスの関連については、研究者によって結果が異なり依然不明のままであった。また、一般に脳組織は薬物の到達効率が悪く、生体に投与されたFas/Fasリガンドによるアポトーシスを抑制する薬剤が、脳組織内でFas/Fasリガンドによるアポトーシスを抑制できるかどうかとも未知であり、遺伝的にFasあるいはFasリガンドを欠損したマウスと同じ結果が得られるかどうかとも不明であった。

現在までにアポトーシスを抑制することによる自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤はなく、またFasリガンドに結合する治療剤も報告されていない。

# 【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アポトーシスを抑制するという新規な作用機序による自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明はアポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤及び治療方法を提供する。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、自己免疫性脱髄性疾患患者を救うべく、アポトーシスと当該疾患の関連性を鋭意研究してきたが、自己免疫性脱髄性疾患モデルにおいてアポトーシスを抑制する物質が病態を改善することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の予防・治療剤に関するものである。

(1) アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤。

(2) 前記アポトーシスを抑制する物質が Fas アンタゴニストである (1) に記載の予防・治療剤。

(3) 前記アポトーシスを抑制する物質が Fas-Fas リガンドの結合を抑制する物質である (1) または (2) に記載の予防・治療剤。

(4) 前記アポトーシスを抑制する物質が Fas 誘導体である (1) ~ (3) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(5) 前記アポトーシスを抑制する物質が抗 Fas リガンド抗体である (1) ~ (3) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(6) 前記自己免疫性脱髄性疾患が中枢神経系に脱髄が起きている疾患である (1) ~ (5) のいずれかに記載の予防・治療剤。

(7) 前記自己免疫性脱髄性疾患が急性散在性脳脊髄炎及び多発性硬化症からなる群から選ばれる少なくとも1つである (1) ~ (5) のいずれかに記載の予防・治療剤。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の予防・治療剤の対象となる自己免疫性脱髄性疾患には種々の疾患が含まれる。大別すると脱髄状態が中枢神経に起きている疾患または脱髄状態が末梢神経に起きている疾患に分類される。好ましくは、脱髄状態が中枢神経に起きている疾患が本発明の対象となる。

脱髄状態が中枢神経に起きている疾患には急性散在性脳脊髄炎または多発性硬化症等が含まれる。急性散在性脳脊髄炎には特発性急性散在性脳脊髄炎、ウィルス感染性急性散在性脳脊髄炎またはワクチン接種後の急性散在性脳脊髄炎等が含まれる。多発性硬化症には同心円性硬化症または視神経脊髄炎 (Devic 病) 等が含まれる。これらの疾患、特に多発性硬化症は、寛解と再発を繰り返すが、寛解時には予防剤として、再発時には治療剤としてそのいずれの時期においても本発明の対象となる。

脱髄状態が末梢神経に起きている疾患には慢性炎症性脱髄性多発性神経根炎または急性炎症性脱髄性多発性神経根炎等が含まれる。急性炎症性脱髄性多発性神経根炎には Guillain-Barré 症候群等が含まれる。

これらの疾患において、アポトーシスを抑制する物質が各疾患で起こっているアポトーシスを抑制し、疾患の治療効果をもたらす。また、これらの疾患の寛解時またはこれらの疾患の病態傾向を有する時に、アポトーシスを抑制する物質が各状況で起こっているまたは起こりつつあるアポトーシスを抑制し、疾患の予防効果をもたらす。

本発明の予防・治療剤の予防には、疾患が初めて起こる事を防ぐ際の予防、及び疾患が寛解後に再燃する際の再発予防等が含まれる。

なお、治療対象としてはヒトが重要であるが、ヒト以外の哺乳類も含みうる。

#### 【0012】

本発明で使用されるアポトーシスを抑制する物質とは、アポトーシスを抑制または阻害するものであれば特に限定されない。

具体的には Fas アンタゴニストまたは Fas-Fas リガンドの結合を抑制する物質がある。これらは、Fas によるシグナルの発生または伝達をいずれかの段階で遮断し、Fas/Fas リガンド系の機能または生物作用 (特にアポトーシス) を抑制するものであれば特に限定されず、Fas リガンド若しくは Fas

s の作用、機能若しくは発現を抑制するもの、F a s リガンド細胞外領域若しくは F a s 細胞外領域と相互作用するもの、F a s リガンドと F a s の相互作用を抑制するもの、F a s 細胞内領域とそれと相互作用する細胞内因子との相互作用に影響するもの、または F a s を介するアポトーシスのシグナル伝達に関する細胞内因子（例えば I C E 様プロテアーゼ）の活性を抑制するもの等のさまざまな作用機序を有するものが含まれる。また、タンパク質性の高分子物質または低分子の化合物のいずれもが含まれる。

## 【0013】

より具体的には、F a s を介するアポトーシスを抑制する活性を有する、F a s 誘導体、抗 F a s 抗体、抗 F a s リガンド抗体、F a s 若しくは F a s リガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s 若しくは F a s リガンドの mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s の細胞内領域と相互作用する物質または I C E 阻害剤が挙げられる。ここで、本発明で用いるアポトーシスを抑制する物質としては、F a s を介するアポトーシスを抑制する作用を有する、F a s 誘導体、抗 F a s 抗体または抗 F a s リガンド抗体が好ましい。さらに、抗 F a s 抗体または抗 F a s リガンド抗体はその治療対象由来のそれぞれ F a s または F a s リガンドを抗原とする抗体が好ましい。例えば、ヒトの治療にはヒト由来の F a s または F a s リガンドを抗原とする抗体すなわち抗ヒト F a s 抗体または抗ヒト F a s リガンド抗体が好ましい。

## 【0014】

また、抗 F a s リガンド抗体はキメラ抗体またはヒト化抗体が好ましい。キメラ抗体は、例えばヒトの治療にはヒト抗体からの定常領域及び非ヒト抗体からの可変領域からなるキメラ抗体が好ましい。ヒト化抗体は、例えばヒトの治療には定常領域及びフレームワーク領域（F R）がヒト由来で、相補性決定領域（C D R）が非ヒト由来であるのが好ましい。非ヒト抗体は、ヒトの治療に用いる際には比較的循環半減期が短い、重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠くまたは免疫原性を有する等の生物学的短所が生じることがある。キメラ抗体またはヒト化抗体はこれらを克服する。

また、本発明で用いる F a s アンタゴニストは、W O 95/13293 号公報

などに記載されている適当なアッセイ法においてFas発現細胞のアポトーシスを抑制するものが好ましい。(本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。)

【0015】

なお、本発明で用いられる抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、また、本発明に使用される抗体の分子種は特に限定されない。抗原に結合しFasを介するアポトーシスを阻害するかぎり、通常の形態の抗体分子であってもよいし、抗体の断片も使用することができる。これらのうちでも特に平成7年6月22日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し(受託番号P-15002)、さらに平成8年5月9日付で原寄託から国際寄託に移管した(受託番号FERM BP-5535)ハイブリドーマF919-9-18により産生されるマウスF919-9-18抗体が好ましい例である。

本発明で用いる抗Fasリガンド抗体または抗Fas抗体は、公知技術を利用して作製することが出来る。例えばWO95/13293号公報及びWO95/02290号公報等に作成方法が記載されている。(本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。)

本発明で用いる事ができるキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法を用いて製造することができる。例えばWO95/13293号公報の実施例1にキメラ蛋白質の作成方法が記載されている。(本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。)

【0016】

本発明に用いるヒト化抗体は、Riechmann L. 等、Nature、332巻、323頁、1988年、第0239400号ヨーロッパ特許公報、Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、10029号、1989年、WO90/07861号公報、WO92/11018号公報、Co等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻、2869頁、1991年、Co等、Nature、351巻、501頁、1991年及びCo等、J. Immunol.、148巻、1149頁、1992年等に開示

されている方法を用いて製造することができる。（本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）本発明の好適な例としては、WO97/02290号公報の実施例に開示されているマウス抗体F919-9-18抗体のCDRを有するヒト化抗Fasリガンド抗体が挙げられる。

## 【0017】

本発明で使用されているFas誘導体は、少なくともFasリガンドとの結合能を有するかまたはFasリガンドによるアポトーシスを抑制するものであれば、特に限定されない。公知のFasアミノ酸配列中に1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加といった任意の変異を有し、Fasリガンドとの結合活性を維持したまま、Fas/Fasリガンド系の生物作用（特にFasを介するアポトーシス）を抑制するものが含まれる。具体的には、Fas変異体、切断型（truncated form）Fas、キメラタンパク質、融合タンパク質または化学的に修飾されたもの等が含まれる。なお、その由来となるFasは上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

## 【0018】

より具体的には、公知のFasの細胞外領域若しくは膜貫通領域を欠失したFas、またはFas細胞外領域と他のタンパク質とのキメラタンパク質（例えばヒトFas細胞外領域とヒト免疫グロブリンのFc領域のキメラタンパク質であるヒトFas-Fc等）が挙げられる。Fas誘導体は、いずれの製法のもので良く、公知の配列及び公知の遺伝子組換え技術等により製造することができる。例えばWO95/13293号公報の実施例1及びWO97/42319号公報の実施例中等に作成方法が記載されている。（本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。）

また、FasのN末端に欠失を有するFas誘導体も好ましく、これらのうちでも特に平成8年3月14日付けで日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P-15514及び受託番号P-15515）、さらに平成9年3月6日付で原寄託から国際寄託に移管（受託番号FERM BP-5854及び受託番号FERM BP-5855）さ

れている大腸菌が含むプラスミド (pM1304 及び pM1317) にコードされている Fas 誘導体 shFas (nd29) -Fc (WO97/42319 号公報) は、公知のヒト Fas の N 末端の 1 番目から 29 番目までのアミノ酸を欠失した Fas 細胞外領域を含有する誘導体であり、活性が高く、本発明の肝硬変の予防・治療剤の有効成分として好適な例である。(本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。)

これらの本発明に用いる Fas 誘導体は、適当なアッセイ法により Fas リガンドに結合活性または Fas を介するアポトーシスの抑制活性を有することがわかる。

#### 【0019】

本発明で使用される Fas 若しくは Fas リガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは Fas 若しくは Fas リガンドの mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Fas または Fas リガンドの発現を抑制するものであれば、その配列は限定されない。その例として WO95/13293 号公報の実施例 20 に開示されている Fas リガンドのアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。(本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。)

#### 【0020】

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、自己免疫性脱髄性疾患患者に対して治療剤として使用することが可能である。また、全身性自己免疫疾患若しくは神経系以外の臓器特異的自己免疫疾患有する患者、ウィルス感染者またはワクチン接種者等に対して自己免疫性脱髄性疾患に対する予防剤として使用することが可能であり、さらに自己免疫性脱髄性疾患、特に多発性硬化症等の寛解と再発を繰り返す疾患に対して寛解時に再発予防剤として使用することが可能である。

#### 【0021】

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、上述のアポトーシスを抑制する物質を含有することを特徴とし、少なくとも一種の医薬用担体または媒体 (例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸または

無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤または無痛化剤等）を適宜組み合わせて医薬組成物やキットの形態を取ることができ、経口的に、または静脈内、冠動脈内、皮下、筋肉内、経皮、吸入、直腸内若しくは局所等の非経口的に投与することができる。

好ましくは非経口的に、全身または局部的に、急速または持続的に投与することができる。

#### 【0022】

ヒトに対する投与量は患者の病態、年齢または投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0.01～1,000mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが可能である。その範囲において約0.01～100mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが好ましい。しかしながら、本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤の使用はこれらの投与方法または投与量に限定されるものではない。さらに、Fasアンタゴニスト、Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質若しくは抗Fasリガンド抗体等の複数のアポトーシスを制御する物質を組み合わせ使用しても、または他の薬剤と併用しても良い。

#### 【0023】

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は常法に従って製剤化することができる。例えば注射用製剤は、精製されたアポトーシスを抑制する物質（Fasアンタゴニスト、Fas-Fasリガンドの結合を抑制する物質若しくは抗Fasリガンド抗体等）を生理食塩水若しくは緩衝液等の溶剤に溶解し、必要に応じて吸着防止剤等を加えて製剤化する。また、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥させたり、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を加えたりして製剤化しても良い。

#### 【0024】

本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤に用いるアポトーシスを抑制する物質は、自己免疫性脱髄性疾患モデル（特に実施例で示す様な中枢神経系に脱髄を起こす脱髄性疾患モデル）において、臓器及び組織の障害の抑制効果を示す

。実施例で示す臓器及び組織の障害の抑制効果は予防効果、治療効果及びそれらの合いまった効果であるが、病態の再発モデルで検討することにより再発予防効果を示すことができる。さらに、実施例では、マウスを用いたモデルで実験を行っているため、抗マウス Fas リガンド抗体を使用し臓器及び組織の障害の抑制効果を示しているが、ヒトに用いる場合は抗ヒト Fas リガンド抗体により実施例と同様の効果が期待できる。

なお、本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、実施例において示すとおり毒性がなく、安全に使用できる。すなわち、本発明の自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、自己免疫性脱髄性疾患に対して予防、治療または改善作用が期待される。

#### 【0025】

##### 【実施例】

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは実施の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。

本発明の抗 Fas リガンド抗体、ヒト化抗 Fas リガンド抗体及び Fas 誘導体の製法及びアポトーシス抑制活性は WO 97/02290 号公報及び WO 97/42319 号公報の実施例に開示されている。

#### 【0026】

##### 実施例 1 抗マウス Fas リガンド抗体の作製、生産及び精製

###### (1) 抗マウス Fas リガンド抗体の作製

可溶性マウス Fas リガンド WX2 (J. Immunology, 157 巻、3918-3924 頁、1996 年) 由来のマウス Fas リガンド細胞外領域とマウス CD40 リガンドの細胞内領域、膜貫通領域および細胞外領域の一部 (N 末端から 78 アミノ酸) を融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子をヒトエロンゲーションファクター (EF) プロモータの下流に有するプラスミドを作製した (Mizushima-Nagata, Nucleic Acids Research, 18 巻、5322 頁、1990 年)。上記プラスミドを WR19L

細胞にトランスフェクトし、細胞膜上にマウス Fas リガンドを発現している組換え細胞 W40LFL を得て、投与抗原として用いた。免疫動物としてアルメニアハムスターを用いた。フロイント完全アジュバントと混合した  $1 \times 10^7$  個の W40LFL をアルメニアハムスターの皮下に投与し、1ヶ月後に PBS に懸濁した  $2 \times 10^7$  個の W40LFL を皮下に投与した。さらに1ヶ月後、PBS に懸濁した  $5 \times 10^6$  個の W40LFL をフットパッドに投与した。3日後、リンパ節細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3-U1) と細胞融合した。HAT 培地 (ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン) による選択の後、生育したハイブリドーマの中から、その培養上清中にマウス Fas リガンドによる細胞障害性を中和する活性を有するハイブリドーマ FLIM58 を得た。

## (2) FLIM58 の生産および精製

ハイブリドーマ FLIM58 を無血清培地 Hybridoma-SFM (GIBCO BRL) にて培養し、その培養上清をプロテイン-Aカラム (PROSEP-A、Bioprocessing) で精製し、精製抗体 FLIM58 を得た。蛋白濃度は 280 nm の吸光度より算出した。

【0027】

## 実施例2 抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 の毒性試験

### (1) 方法

雄性、8週齢、DBA/1J マウスおよび C3H/He マウス (日本チャールス・リバー製) を用いた。抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 を  $100 \text{ mg} / 30 \text{ ml} / \text{kg}$  の用量で尾静脈から投与した。またコントロール群には生理食塩水を  $30 \text{ ml} / \text{kg}$  の用量で尾静脈から投与した。2種の系統ともに各群3例とした。観察期間を7日間とし、体重測定、血液学的検査 (赤血球、白血球、血小板)、血液生化学的検査 (GOT、GPT、尿素窒素)、肉眼による剖検を行った。

### (2) 結果

抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 投与群の投与後の体重増加、血液学的検査値 (赤血球、白血球、血小板)、血液生化学的検査値 (GOT、GPT、

尿素窒素)はコントロール群と比べて差を認めなかった。また、肉眼による剖検所見においても抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 投与群に異常は認められなかった。

【0028】

実施例3 抗マウス Fas リガンド抗体 FLIM58 のラット EAE モデル (養子免疫モデル、adoptive transfer model) の病態改善効果

(1) ラット養子免疫モデルの作製

1mg/ml の H37Ra 結核死菌を含有するフロイント完全アジュバント (Difco Laboratories 製) 10ml を 1000 回転、5 分間遠心し、得られた沈殿を 1.6ml のフロイント不完全アジュバント (Difco Laboratories 製) に再懸濁し、H37Ra 結核死菌濃度を高めた完全アジュバントを作製した。モルモット脳由来ミエリン塩基性蛋白 (Sigma 製) を 2.5mg/ml となるように生理食塩水に溶解し、上述の H37Ra 結核死菌濃度を高めた完全アジュバントと 1:1 に混合し、ルアーロック型ハミルトンガスタイトシリンジ (中央化学工業製) を用いてエマルジョンを作製した。

雌性、11 週齢、Lewis ラットを 50mg/kg のペントバルビタール (大日本製薬製) を腹腔内に投与して麻酔した後、両後肢 (Foot pad) に上述のエマルジョン 0.1ml をそれぞれ投与した。14 日後、脾臓を摘出し、ピンセットを用いてほぐした後、遠心し、得られた細胞沈殿を 0.017M トリス-0.747% 塩化アンモニウム溶液中に懸濁し、赤血球のみ溶血させた。残った細胞をハンクス液 (日水製薬製) で洗浄し、脾細胞とした。脾細胞を  $4 \times 10^6$  個/ml の濃度で 25  $\mu$ g/ml モルモット脳由来ミエリン塩基性蛋白、2mM L-グルタミン (日水製薬製)、10% 非働化 FBS (JRH Bioscience 製) 含有 RPMI 1640 培地 (GIBCO BRL 製) に植え込み、5% 炭酸ガス存在下 37℃ で 3 日間培養した。脾細胞培養液を 1,000 回転、5 分間遠心した後、細胞沈殿をハンクス液に再懸濁した。この脾細胞を、雌性、11 週齢、Lewis ラットに  $1.2 \times 10^7$  個/2ml/ラットの用量で

腹腔内に移植してEAEモデルを作製した。

【0029】

(2) 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の投与

10mg/kgの抗マウスFasリガンド抗体FLIM58を脾細胞移植の当日(day 0)および移植6日後(day 6)に尾静脈から投与した。コントロール群には、正常ハムスターγグロブリン(ROCKLAND製)からプロテインAカラムを用いて精製したIgGを等量投与した。各群5例ずつとした。

(3) 評価

下記に示す表1のクライテリアを基に病態をスコア化(Experimental Neurology, 151巻, 221~228頁, 1995年)し、FLIM58の投与効果を調べた。

【0030】

表1 ラットEAEモデルの病態スコア

スコア	病 態
スコア 0	正 常
スコア 0.5	尾に不完全な麻痺がある (持ち上げた尾が正常ラットよりやややく落ちる)
スコア 1	尾に完全な麻痺がある (持ち上げた尾がパタンと落ちる)
スコア 2	後脚の片方に麻痺がある
スコア 3	後脚の両方に麻痺がある
スコア 4	瀕 死
スコア 5	死 亡

【0031】

## (4) 結果

結果を図1及び図2に示す。病態はday5～day6に発生し、day6以降においてFLIM58投与群の病態はコントロール群よりも軽度であった。また、病態発症に伴う体重減少はday4～day5から起こり、day5以降においてFLIM58投与群の体重減少はコントロール群よりも軽度であった。

【0032】

実施例4 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58のラットEAEモデル（感

作モデル、actively immunization mode

1) の病態改善効果

(1) ラット感作モデルの作製

実施例3と同様にミエリン塩基性蛋白と完全アジュバントの1:1エマルジョンを作製し、麻酔下でラットの両足に0.1ml/Foot padの用量を(0.2ml/ラット)投与した。

(2) 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の投与

10mg/kgの抗マウスFasリガンド抗体FLIM58を脾細胞移植7日後(day7)に尾静脈から投与した。コントロール群には、正常ハムスターγ-グロブリン由来精製IgGを等量投与した。各群5例ずつとした。

(3) 評価

実施例3に示した表のクライテリアを元に病態をスコア化し、FLIM58の投与効果を調べた。

(4) 結果

病態はday10に発生した。FLIM58投与群の病態はコントロール群よりも軽度であった。

【0033】

【発明の効果】

本発明のアポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤は、アポトーシスの抑制作用により、特にFasを介した細胞の死に代表されるFas/Fasリガンド系の生物作用等のアポトーシスが関与する自己免疫性脱髄性疾患の予防または治療効果を有する。従って、本発明のアポトーシスを抑制する物質は、Fasを介した細胞の死等、アポトーシスが関与する自己免疫性脱髄性疾患の疾患の予防・治療剤として期待される。

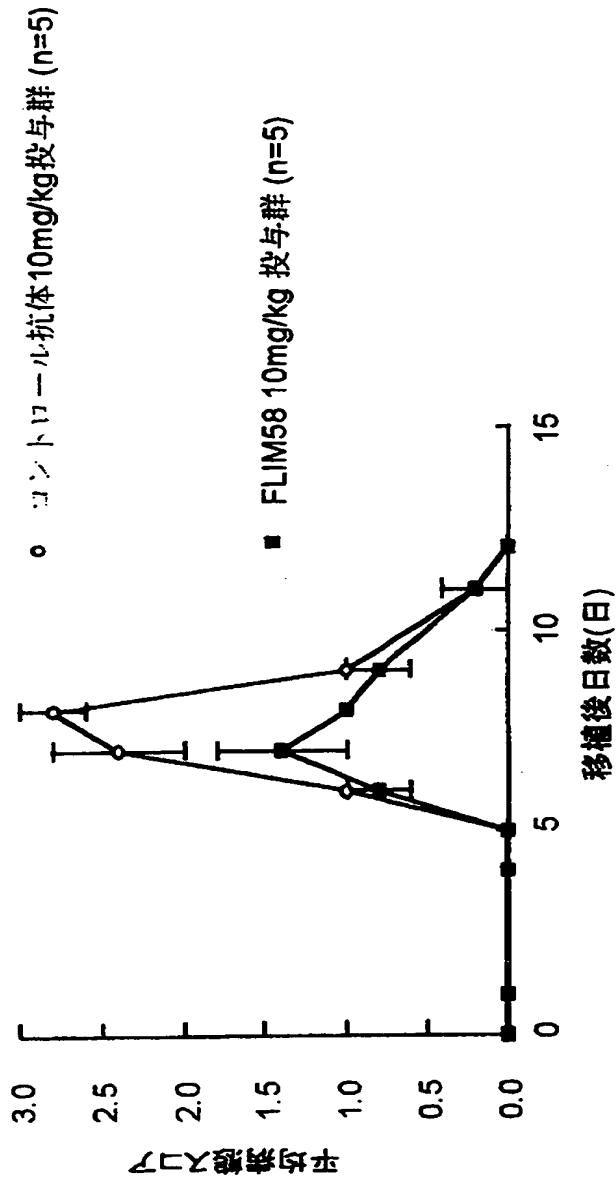
【図面の簡単な説明】

【図1】 FLIM58のラットEAEモデルにおける病態の改善効果を示すグラフである。

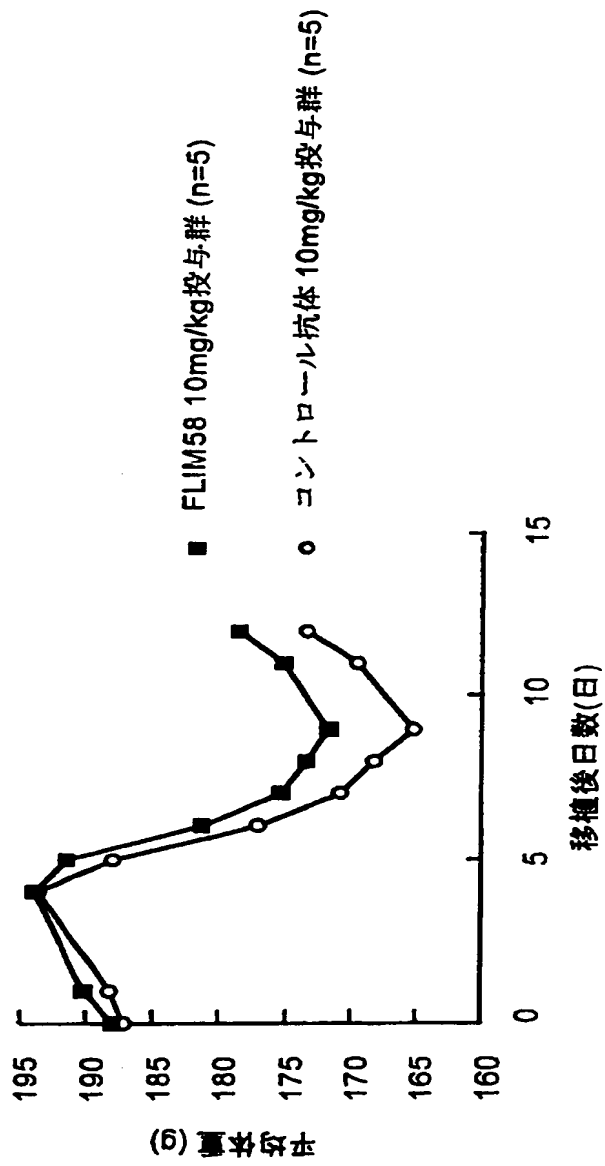
【図2】 FLIM58のラットEAEモデルにおける体重減少の改善効果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な自己免疫性脱髄性疾患予防。治療剤。

【解決手段】 アポトーシスを抑制する物質を有効成分とする自己免疫性脱髄性疾患の予防・治療剤。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000181147

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目7番地

【氏名又は名称】

持田製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100080159

【住所又は居所】

東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナ  
カィビル3階 いおん特許事務所

【氏名又は名称】

渡辺 望稔

【選任した代理人】

【識別番号】

100090217

【住所又は居所】

東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナ  
カィビル3階 いおん特許事務所

【氏名又は名称】

三和 晴子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000181147]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区四谷1丁目7番地
氏 名	持田製薬株式会社